



Revisado por: _____

Data: _____

ELISA IgM para zika

Versão resumida do protocolo do CDC

Observação: consulte o protocolo completo não EUA antes do teste para obter mais informações. Este documento é um guia do trabalho em laboratório.

1. Prepare a placa Immulon 2HB: marque a posição das amostras e dos controles. Use apenas os 60 poços internos.
2. Revista a placa com 75 μ L de IgM anti-humano por poço diluído a 1:2000 em tampão de revestimento, pH 9,6.
3. Cubra a placa e incube-a a 4 °C durante a noite (pelo menos 16 horas).
4. Remova o líquido da placa e seque-a com material absorvente.
5. Bloqueie os poços com 200 μ L de tampão de bloqueio por poço.
6. Cubra a placa e incube-a à temperatura ambiente por 30 minutos.
7. Enquanto isso, dilua o soro do paciente e o controle negativo a 1:400 em tampão de lavagem; dilua o controle positivo de acordo com sua titulação (sugestão de 1:3000 para o controle de flavivírus quimérico). Use líquido cefalorraquidiano (LCR) não diluído ou a um máximo de 1:5 em tampão de lavagem e inclua um controle de LCR negativo na placa.
8. Lave a placa 5 vezes com o tampão de lavagem usando uma lavadora de placas automática e 300 μ L por poço e por ciclo de lavagem. Se uma lavadora automática não estiver disponível, lave a placa 3 vezes adicionando 200 μ L de tampão de lavagem por poço e descarte o tampão em um recipiente ou uma pia após cada adição. Segue a placa usando toalha de papel.
9. Adicione 50 μ L de controles e soros diluídos do paciente aos poços apropriados da placa, 6 poços por amostra correspondendo a 3 réplicas em antígenos viral e normal. Certifique-se de que os poços não sequem antes da adição dos soros. O LCR deve ser testado em triplicata.
10. Cubra a placa e incube-a por 1 hora a 37 °C em uma câmara úmida (por exemplo, uma sacola plástica vedada contendo uma toalha de papel molhada).
11. Enquanto isso, dilua os antígenos normal e viral para zika em tampão de lavagem (sugestão de 1:160 para antígenos Vero E6 e 1:800 para antígenos COS-1).

12. Repita a lavagem no ponto 8.
13. Adicione 50 μL de antígeno viral a 3 poços por amostra e 50 μL de antígeno normal a 3 poços por amostra e controle.
14. Incube durante a noite a 4 °C em câmara úmida.
15. Repita a lavagem no ponto 8.
16. Dilua o conjugado de detecção (peroxidase de rábano silvestre 6B6C-1) em tampão de bloqueio (sugestão de 1:4000 para conjugados comerciais; 1:5000 para o conjugado do CDC).
17. Adicione 50 μL de conjugado diluído por poço a todos os poços.
18. Incube a placa coberta por 1 hora a 37 °C em câmara úmida.
19. Enquanto isso, remova a garrafa de substrato TMB do refrigerador e deixe-a em temperatura ambiente.
20. Lave a placa 10 vezes, girando a placa na lavadora na metade do ciclo. Se uma lavadora de placas não estiver disponível, lave a placa 6 vezes de acordo com o ponto 8.
21. Adicione 75 μL de substrato TMB por poço. Coloque a placa em um local escuro e incube-a à temperatura ambiente por 10 minutos.
22. Adicione 50 μL de 1 N H_2SO_4 por poço ou 75 μL por poço de solução de parada KPL TMB a todos os poços, incluindo os poços externos, e leia a placa após 1 minuto a 450 nm.
23. Calcule os resultados da seguinte forma:
 - (P) DO controle positivo com reação ao antígeno do zika
 - (N) DO controle negativo com reação ao antígeno do zika

Se o P/N resultante do soro de controle positivo for ≥ 2 , o teste será válido. Se ele for < 2 , o teste deverá ser repetido.

A fórmula a seguir é aplicada aos soros do paciente:

- (P) DO da amostra do paciente com reação ao antígeno do zika
- (N) DO controle negativo com reação ao antígeno do zika

Os resultados da amostra de um paciente com um valor de P/N $\geq 3,0$ são considerados como suspeita de positivo.

Os resultados da amostra de um paciente com um valor de P/N $\geq 2,0$, mas $< 3,0$ são considerados como duvidosos.

Os resultados da amostra de um paciente com um valor de P/N $< 2,0$ são considerados como negativos.

Todos os resultados positivos ou duvidosos deverão ser verificados em reação ao antígeno normal, de acordo com a seguinte fórmula:

DO da amostra do paciente com reação ao antígeno do zika
DO da amostra do paciente com reação ao antígeno normal

Se o resultado for <2, isso indicará reação de fundo e o resultado desse paciente não poderá ser interpretado.

Nos casos em que a amostra do paciente é negativa E ela foi obtida <9 dias após o início dos sintomas, uma amostra convalescente deverá ser obtida, já que a amostra pode ter sido obtida antes do desenvolvimento de anticorpos.

Materiais e reagentes

Tampão de revestimento:

Tampão de carbonato/bicarbonato, pH 9,6
1,59 g de Na₂CO₃ + 2,93 g de NaHCO₃ diluído em 1 L de água.

Tampão de lavagem:

Fosfato salino tamponado (PBS), 0,05% Tween 20, pH 7,2.
O PBS está disponível em pó de várias fontes comerciais.

Tampão de bloqueio:

PBS/5% leite/ 0,5% Tween 20

Anticorpo de revestimento:

IgM anti-humano (cabra)
Kirkegaard and Perry Laboratories cat. n° 01-10-03

Antígeno viral:

Antígeno de cultura de tecido com radiação gama, não infeccioso, previamente titulado (CDC) ou antígeno COS-1, não infeccioso (CDC).

Antígeno normal:

Antígeno de cultura de tecido de animais não infectados (mock-infected) (CDC) ou antígeno COS-1, não infeccioso (CDC).

Deteção de anticorpo conjugado:

Anticorpo monoclonal conjugado com peroxidase de rábano silvestre 6B6C-1 (InBios International ou Hennessy Research – para uso apenas com antígeno Vero E6) ou do CDC mediante acordo especial.

Substrato:

3,3',5, 5' base tetrametilbenzidina (substrato Enhanced K-Blue TMB), Neogen Corp.

Cat. n° 308175

Placas: Placas Immulon II HB de fundo chato de 96 poços

Dynatech Technologies, catálogo n° 3455

Lavadora de microplacas

Leitor de microplacas

Incubadora

Pipetadores de canal único e multicanal Reservatório de reagentes

Sacos Ziploc, papel toalha